

Alternativa substrat för ett RNA-enzym

David Kosek

I cellens proteinsyntes används transfer-RNA (tRNA) för att transportera aminosyror. tRNA-molekyler transkriberas från genomet i en icke-funktionell form som behöver modifieras innan de kan utföra sina uppgifter. Ett steg i processen är att en nukleotidsekvens i molekylenas ena ände klipps bort av enzymet ribonukleas P. Ribonukleas P består av en RNA-molekyl och en eller flera proteinheter, vars antal varierar mellan bakterier, arkéer och eukaryoter. Den katalytiska aktiviteten sitter i RNA-enheten, vilket gör ribonukleas P till ett så kallat ribozym, och *in vitro* är inte proteinerna nödvändiga för att reaktionen ska äga rum. Ribonukleas P finns i någon form i nästan alla kända organismer och tros härstamma från den RNA-värld som förmodas ha existerat innan den moderna cellen uppkom. Att studera ribonukleas P:s funktion och evolution kan således ge ledtrådar om det tidiga livet på jorden och hur cellulära system utvecklats fram till idag.

En intressant upptäckt är att ribonukleas P - både med och utan protein - kan klyva inte bara tRNA-föregångare utan också ett stort antal andra RNA-substrat av olika slag. Bland annat kan ribozymet katalysera reaktioner med de tRNA-liknande strukturer som återfinns i ändarna av RNA-genom hos vissa virus. Det har spekulerats att sådana strukturer kan ha spelat en roll i evolutionen av både tRNA och ribonukleas P.

I det här projektet studerade jag ribonukleas P-klyvning av ett konstgjort substrat med en liknande struktur, i syfte att förstå vilka egenskaper hos RNA-molekyler som gör det möjligt för dem att interagera med ribozymet, och vilka de minimala förutsättningarna för klyvningsreaktionen är. Jag undersökte effekten av punktmutationer både i ribozymet och substratet på den katalytiska reaktionen och fann att en av nukleotiderna alldeles intill klyvningsstället har en avgörande effekt på var och hur snabbt substrat-RNA:t klyvs, vilket stämmer överens med tidigare data, men att även nukleotider längre bort i strukturen spelar roll för reaktionen. Ribonukleas P-katalys är beroende av metalljoner, och vi kunde även visa att vissa mutationer påverkar hur joner binder till substratet.

Det finns ett antal strukturella varianter av ribonukleas P-RNA i organismer med olika evolutionära ursprung. För att undersöka eventuella skillnader i egenskaper mellan dessa gjorde vi experiment med ribozym från två olika bakterier (*Escherichia coli* och *Mycoplasma hyopneumoniae*) och en arké (*Pyrococcus furiosus*). Vi kunde påvisa tydliga skillnader på hur dessa reagerade med substratet, vilket tyder på att evolutionära förändringar hos ribonukleas P påverkat dess katalytiska egenskaper och hur det kan interagera med olika RNA-molekyler.